

09/000562

4

PCT/JP 00/00531

01.02.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 2月 2日

出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第025392号

出 願 人
Applicant(s):

シーシーアイ株式会社
吉川 敏一

REC'D 31 MAR 2000

WIPO PCT

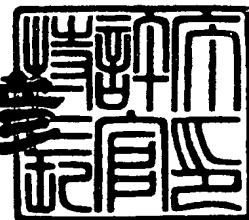
**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 3月 3日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3011618

【書類名】 特許願
【整理番号】 98P0535
【提出日】 平成11年 2月 2日
【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿
【国際特許分類】 C07D311/72
【発明の名称】 動脈硬化症予防および治療剤
【請求項の数】 4
【発明者】
【住所又は居所】 岐阜県岐阜市長良 2 4 3 5 番地の 1 7 8
【氏名】 村瀬 博宣
【発明者】

【住所又は居所】 京都府宇治市菟道荒槇 1 - 5 1
【氏名】 吉川 敏一
【発明者】
【住所又は居所】 京都府京都市左京区下鴨北園町 7 6
【氏名】 吉田 憲正

【特許出願人】
【識別番号】 000106771
【氏名又は名称】 シーシーアイ株式会社

【特許出願人】
【住所又は居所】 京都府宇治市菟道荒槇 1 - 5 1
【氏名又は名称】 吉川 敏一

【代理人】
【識別番号】 100072349
【弁理士】
【氏名又は名称】 八田 幹雄
【電話番号】 03-3230-4766

【選任した代理人】
【識別番号】 100102912

【弁理士】

【氏名又は名称】 野上 敦

【選任した代理人】

【識別番号】 100110995

【弁理士】

【氏名又は名称】 奈良 泰男

【選任した代理人】

【識別番号】 100111464

【弁理士】

【氏名又は名称】 齋藤 悦子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001719

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

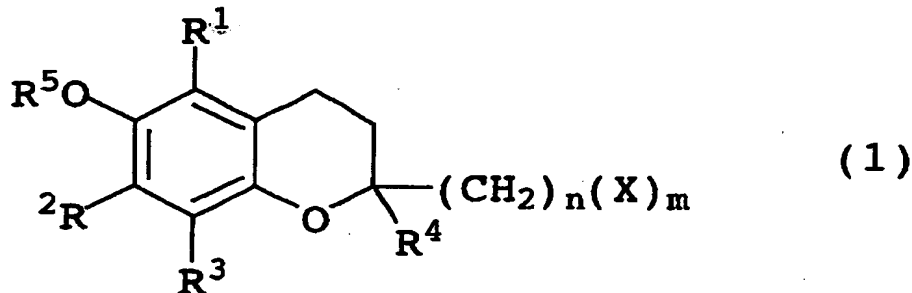
【書類名】 明細書

【発明の名称】 動脈硬化症予防および治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記一般式 (1)

【化 1】



【ただし、式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は同一または異なる水素原子または低級アルキル基を表し、 R^5 は水素原子、低級アルキル基または低級アシル基を表し、Xは糖残基中の水酸基の水素原子が低級アルキル基または低級アシル基で置換されていてよい単糖残基またはオリゴ糖残基を表し、nは0～6の整数であり、およびmは1～6の整数である】で表されるクロマノール配糖体を有効成分とする動脈硬化症予防および治療剤。

【請求項 2】 前記クロマノール配糖体は 2 - (α -D-グルコピラノシル)メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オールである請求項 1 記載の動脈硬化症予防および治療剤。

【請求項 3】 前記動脈硬化症はアテローム性動脈硬化症である請求項 1 または 2 記載の動脈硬化症予防および治療剤。

【請求項 4】 水性製剤である請求項 1 ～ 3 記載の動脈硬化症予防および治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な動脈硬化症予防および治療剤に関する。詳しくは、水溶性のクロマノール配糖体を有効成分とする動脈硬化症予防および治療剤に関するもの

である。

【0002】

【従来の技術】

動脈硬化は、動脈壁の改築、硬化、機能低下を示す限局性の動脈病変の総称であり、なかでも血管壁にコレステロールを主とする脂質の沈着をみるアテローム性動脈硬化は臨床的に重要であり、冠状動脈、脳動脈、腎動脈、四肢の動脈のアテローム性硬化は、管腔を狭窄し血栓形成等を伴って、心筋梗塞、脳梗塞、腎梗塞、四肢の壊死を起こす。

【0003】

アテローム性動脈硬化症の発症、進展には数多くの因子が関与していると考えられているが、最近になって、活性酸素やフリーラジカルによって酸化変性を受けた低比重リポタンパク質（LDL）が重要な役割を果たしていることがわかってきた。すなわち、アテローム性動脈硬化症の初期段階においては、血中の多くの単球が血管内皮細胞に付着し内皮下に進入後マクロファージに分化し、マクロファージのスカベンジャー受容体が酸化LDLを取り込み泡沫細胞化し集積して、初期のアテローム巣を形成するものと考えられる（吉川敏一著「フリーラジカルの医学」株式会社診断と治療社1997年4月25日発行第62～66頁他）。また、酸化LDLは血管内皮細胞を傷害し、血管の保護機構を破壊させアテローム性動脈硬化症に至る過程を誘導するとも考えられている。（Ross, R: The Pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s: Science, 362, 801-809 (1993)）。実際、in vivoにおける酸化LDLの存在も証明され、過酸化リポタンパク質に対するモノクローナル抗体を用いた検討でも動脈硬化巣内にその局在が証明されている（Steinberg, D., et al.: Beyond cholesterol: Modification of low density lipoprotein that increases atherogenicity: N. Engl. J. Med., 320: 915-924 (1989)）。

【0004】

かかる観点から、動脈硬化症に対して抗酸化剤の使用が試みられ、*in vitro*の試験においては、数多くの抗酸化剤についてLDLの酸化抑制効果が確認されている (Sampath Parthesarathy, et al. : Probucol Inhibits Oxidative Modification of Low Density Lipoprotein: J. Clin. Invest., 77: 641-644 (1986) 他)。しかし、動物実験においては、LDL内部に取り込まれる脂溶性タイプの抗酸化剤を過剰にウサギ等に投与することにより大動脈のアテローム性動脈硬化症の病変面積の減少が認められたとの報告があるものの (Cynshi. O., et al. : Antiatherogenic effects of the antioxidant BO-653 in three different animals models. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95: 10123-10128 (1998))、LDL中には、抗酸化剤として知られているビタミンE、カロテンおよびユビキノールなどが既に存在していることより、かかる脂溶性の抗酸化剤は、臨床的にどれほど有効なものかは不明である。実際にLDLの酸化は、LDLが血管内皮下に移行しそこで血管内皮細胞、血管平滑筋細胞およびマクロファージによって酸化的修飾を受けることによって生じると考えられており、この酸化変性にはこれらの細胞等から発生する活性酸素が関与していると考えられている (Steinberg, D., et al. : Beyond cholesterol: Modification of low density lipoprotein that increases atherogenicity. N. Engl. J. Med., 320: 915-924 (1989))。つまり、LDLの酸化の大部分はLDL外部で発生した活性酸素によって誘導されることから、LDLの酸化抑制には、LDLと反応する前にこれらの活性酸素を消去すること、およびLDL表面で生じた脂質過酸化反応等を素早く停止させることがより重要であると推測される。これに対し、動物実験において水溶性の抗酸化剤の単独投与により動脈硬化を抑制したとの報告はなく、従来の水溶性の抗酸化剤では生体内において活性酸素からLDLを防御するのに適した場に存在できないと考えられる。

【0005】

一方、本発明に用いられるクロマノール配糖体は既知の化合物である（特開平 7-118287号公報）。該クロマノール配糖体は、代表的なビタミンEである α -トコフェロールのクロマン環の2位のフィチル基をアルコールで置換しさらに糖を結合させて得られるものであり、高い水溶性と優れた抗酸化作用を有する。しかし、該クロマノール配糖体を動脈硬化症発症の予防および治療に利用することは知られていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は上記従来技術の有する問題点に鑑みなされたものであり、その目的とするところは、副作用を伴うことなく少用量で効果的に作用し動脈硬化症を予防し、または病態を改善もしくは治癒しうる新規な動脈硬化症予防および治療剤を提供することにある。

【0007】

本発明の他の目的は、有効成分を高濃度で含有する水性製剤とすることができ、新規な動脈硬化症予防および治療剤を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

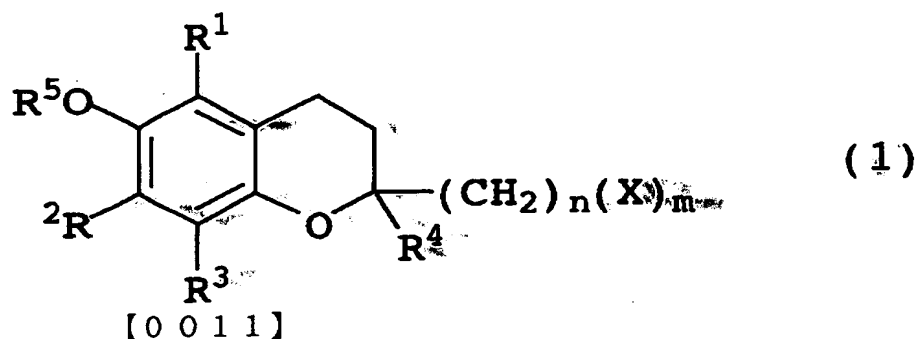
本発明者らは、動脈硬化症の病理について鋭意研究を重ねた結果、前記クロマノール配糖体が、動脈硬化症の病変を劇的に予防および改善することを見出し本発明を完成した。

【0009】

即ち、本発明は、下記一般式（1）

【0010】

【化 2】



【ただし、式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は同一または異なる水素原子または低級アルキル基を表し、 R^5 は水素原子、低級アルキル基または低級アシル基を表し、 X は糖残基中の水酸基の水素原子が低級アルキル基または低級アシル基で置換されていてもよい単糖残基またはオリゴ糖残基を表し、 n は 0 ～ 6 の整数であり、および m は 1 ～ 6 の整数である】で表されるクロマノール配糖体を有効成分とする動脈硬化症予防および治療剤である。

【0012】

本発明はまた、前記クロマノール配糖体は 2- (α -D-グルコピラノシル)メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オールである前記動脈硬化症予防および治療剤である。

【0013】

本発明はさらに、前記動脈硬化症はアテローム性動脈硬化症である前記動脈硬化症予防および治療剤である。

【0014】

本発明はまた、水性製剤である前記動脈硬化症予防および治療剤である。

【0015】

【発明の実施の形態】

本発明の動脈硬化症予防および治療剤は、前記一般式 (1) で表されるクロマノール配糖体を有効成分とすることを特徴とするものである。

【0016】

前記一般式 (1) において、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 および R^5 の低級アルキ

ル基としては、炭素原子数が1～8、好ましくは1～6の低級アルキル基がよく、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基等が挙げられる。これらの中では、メチル基またはエチル基が好ましい。また、 R^5 の低級アシル基としては、炭素原子数が1～8、好ましくは1～6の低級アシル基がよく、例えば、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、バレリル基、イソバレリル基、ピバロイル基、ヘキサノイル基、ヘプタノイル基、オクタノイル等が挙げられる。これらの中では、アセチル基、プロピオニル基またはブチリル基が好ましい。また、Xの単糖残基としては、グルコース、ガラクトース、フコース、キシロース、マンノース、ラムノース、フルクトース、アラビノース、リキソース、リボース、アロース、アルトロース、イドース、タロース、デオキシリボース、2-デオキシリボース、キノボース、アベクオース等の糖残基が挙げられる。Xのオリゴ糖残基としては、上記単糖が2～4個結合したもの、例えばマルトース、ラクトース、セロビオース、ラフィノース、キシロビオース、スクロースの糖残基等が挙げられる。これらの中ではグルコース、ガラクトース、フコース、キシロース、ラムノース、マンノース、フルクトース等の単糖残基が好ましい。また、Xの糖残基中の水酸基の水素原子は低級アルキル基、好ましくは炭素原子数が1～8の低級アルキル基、または低級アシル基、好ましくは炭素原子数が1～10の低級アシル基で置換されていてもよい。さらに、nは0～6、好ましくは1～4の整数であり、mは1～6、好ましくは1～3の整数である。一般式(1)で表されるクロマノール配糖体の好ましい例としては、2-(α -D-グルコピラノシル)メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オール、2-(β -D-ガラクトピラノシル)メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オール、2-(β -L-フコピラノシル)メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オール、2-(α -L-ラムノピラノシル)メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オール、2-(β -D-キシロピラノシル)メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オール、2-(β -D-グルコピラノシル)メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オール、2-(β -D-

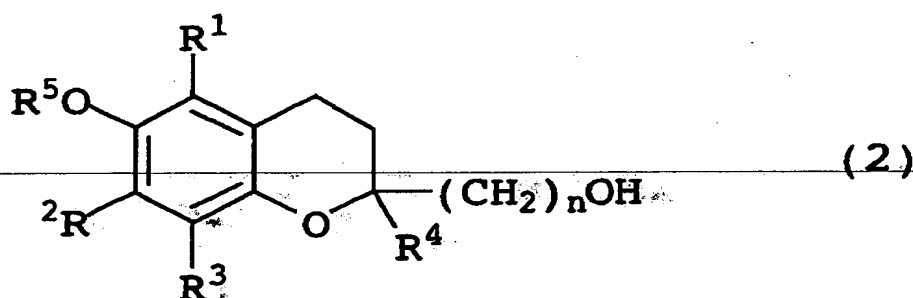
フルクトフラノシル) メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オール、2-(α -D-マンノピラノシル) メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オール等が挙げられる。

【0017】

本発明に用いられるクロマノール配糖体は、例えば特開平7-118287号公報に記載の方法により、下記一般式(2)：

【0018】

【化3】



【0019】

(ただし、式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 及び n は前記と同義である) で表される 2-置換アルコール及びオリゴ糖類、可溶性澱粉、澱粉またはシクロデキストリンを相当する糖転位作用を触媒する酵素の存在下に反応させ、2-置換アルコールの 2 位の水酸基に対して特異的に糖の特定の水酸基を結合させることからなる酵素反応によって製造される(酵素法)。

【0020】

上記反応において原料として用いられる一般式(2)で表される 2-置換アルコール(以下、単に「2-置換アルコール」という)は公知の物質であり、例えば、特公平1-43755号公報や特公平1-49135号公報等の開示された方法により得ることができる。また、例えば、一般式(2)中、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 がメチル基、 R^5 が水素原子であり、 n が 1 である 2-置換アルコールは、トロロックスを水素化リチウムアルミニウムの存在下においてジエチルエーテル中で加熱還流処理すること等により容易に得ることができる。

【0021】

上記反応において使用される糖転位作用を触媒する酵素は、当該反応に用いる糖の種類によって以下のように使い分けることが好ましい。

(1) 2-置換アルコールに α -結合でグルコース残基を結合させる場合：

(a) マルトースからマルトテトラオース位のマルトオリゴ糖に対しては α -グルコシダーゼ (α -glucosidase, EC 3. 2. 1. 20) を作用させることが望ましい。 α -グルコシダーゼとしては、ほぼ全ての起源由来のものを用いることができ、具体的には、東洋紡績株式会社製のサッカロマイセス属 (*Saccharomyces* sp.) 由来の α -グルコシダーゼ、オリエンタル酵母工業株式会社製のサッカロマイセス セロビイシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の α -グルコシダーゼ、天野製薬株式会社製のアスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*) 由来の α -グルコシダーゼ、和光純薬工業株式会社製のサッカロマイセス属 (*Saccharomyces* sp.) 由来の α -グルコシダーゼ、シグマ (SIGMA) 製のベーカー イースト (*Bakers yeast*) 由来の α -グルコシダーゼ、バチルス属 (*Bacillus*) 由来の α -グルコシダーゼ等が挙げられる。

(b) 可溶性澱粉または澱粉に対しては4- α -グルカノトランスフェラーゼ (4- α -D-glucanotransferase, EC 2. 4. 1. 25) を作用させることが望ましい。

(2) 2-置換アルコールに α -結合でグルコース残基またはマルトオリゴ糖残基を結合させる場合：

マルトオリゴ糖、可溶性澱粉、澱粉またはシクロデキストリン (α 、 β 、 γ) などに対してはシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (cyclodextrin glucanotransferase, EC 2. 4. 1. 19) を作用させることが望ましい。代表的な例としては、天野製薬株式会社製のバチルス マセランス (*Bacillus macerans*) 由来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ、株式会社林原生物化学研究所製のバチルス ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) 由来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ等が挙げられる。

hilus) 由来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ、その他にはバチルス メガテリウム (*Bacillus megaterium*)、バチルス サーキュランス ATCC 9995 (*Bacillus circulans* ATCC 9995) 由来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼなどが挙げられる。

(3) 2-置換アルコールに β -結合でグルコース残基を結合させる場合:

(a) セロビオース、カードランまたはラミナランなどの β -結合よりなるオリゴ糖に対しては β -グルコシダーゼ (β -glucosidase, EC 3. 2. 1. 21) を作用させることが望ましい。

(b) リン酸存在下のセロビオースに対してはセロビオース ホスホリラーゼ (*cellulobiose phosphorylase*, EC 2. 4. 1. 20) を作用させることが望ましい。

(4) 2-置換アルコールに α -結合でガラクトース残基を結合させる場合:

(a) メリビオースまたはラフィノースなどに対しては α -ガラクトシダーゼ (α -galactosidase, EC 3. 2. 1. 22) を作用させることが望ましい。

(5) 2-置換アルコールに β -結合でガラクトース残基を結合させる場合:

(a) ラクトースなどに対しては β -ガラクトシダーゼ (β -galactosidase, EC 3. 2. 1. 23) を作用させることが望ましい。

(b) アラビノガラクタンなどに対してはエンドー1, 4- β -ガラクタナーゼ (*Endo-1, 4- β -galactanase*, EC 3. 2. 1. 89) を作用させることが望ましい。

(6) 2-置換アルコールに β -結合でフラクトース残基を結合させる場合:

(a) ショ糖、ラフィノースまたはメリビオースなどに対してはレバンシュークラゼ (*levansucrase*, EC 2. 4. 1. 10) を作用させることが望ましい。

(b) ショ糖に対しては β -フルクトフラノシダーゼ (β -fructofuranosidase, EC 3. 2. 1. 26) を作用させることが望ましい。

(c) イヌリンなどに対してはイヌリンフルクトトランスフェラーゼ (*inul*

in fructotransferase, EC 2. 4. 1. 93) を作用させることが望ましい。

【0022】

上記反応における反応条件は、使用するクロマノール配糖体や酵素の種類によって異なるが、例えば、一般式(1)中のmが1であるクロマノール配糖体を α -グルコシダーゼを用いて合成する場合には、2-置換アルコールを糖溶液に溶解させることが望ましい。そのためには有機溶媒の添加が望ましく、例えば、ジメチルスルホキシド、N, N-ジメチルホルムアミド、メタノール、エタノール、アセトン、及びアセトニトリルなどが挙げられ、 α -グルコシダーゼの転移活性を高める点を考慮すると、ジメチルスルホキシドやN, N-ジメチルホルムアミドが好ましく使用される。有機溶媒の添加濃度は、1~50 (v/v) %であり、反応効率を考えると5~35 (v/v) %であることが好ましい。

【0023】

2-置換アルコールの濃度は、反応液中において飽和濃度若しくはそれに近い濃度にするのが望ましい。用いる糖の種類はマルトースからマルトテトラオース位の低分子のものが良く、好ましくはマルトースである。糖の濃度は1~70 (w/v) %、好ましくは30~60 (w/v) %である。pHは4. 5~7. 5、好ましくは5. 0~6. 5である。反応温度は10~70℃、好ましくは30~60℃である。反応時間は1~40時間、好ましくは2~24時間である。但し、これらの条件は使用する酵素量等により影響をうけることはいうまでもない。反応終了後、反応液をXAD (オルガノ株式会社) を担体として用いたカラムクロマトグラフィーで処理することにより、目的とするクロマノール配糖体が高純度で得られる。

【0024】

また、例えば、一般式(1)中のmが1であるクロマノール配糖体をシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを用いて合成する場合の反応条件としては、2-置換アルコールを糖溶液に溶解させることが望ましい。そのためには有機溶媒の添加が望ましく、ジメチルスルホキシド、N, N-ジメチルホルムアミド、メタノール、エタノール、アセトン及びアセトニトリルなどが挙げられる。

添加する有機溶媒の濃度は 1 ~ 5 0 (v/v) %、好ましくは反応効率を考えると 5 ~ 3 5 (v/v) % である。2-置換アルコールの濃度は反応液中において、飽和濃度もしくはそれに近い高い濃度にすることが望ましい。

【0025】

上記反応において用いられる糖の種類としては、マルトトリオース以上の重合度を持つマルトオリゴ糖、可溶性澱粉、澱粉およびシクロデキストリン (α 、 β 、 γ) などが好ましく挙げられる。糖の濃度は 1 ~ 7 0 (w/v) %、好ましくは 5 ~ 5 0 (w/v) % である。pH は 4. 5 ~ 8. 5、好ましくは 5. 0 ~ 7. 5 である。反応温度は 1 0 ~ 7 0 °C、好ましくは 3 0 ~ 6 0 °C である。反応時間は 1 ~ 6 0 時間、好ましくは 2 ~ 5 0 時間である。但し、これらの条件は使用する酵素量により影響を受ける。このような反応により得られたクロマノール配糖体は m の数が 1 から 8 位の混合物となる。そこで、この混合物をグルコアミラーゼ (EC 3. 2. 1. 3) を用いて処理することによって、一般式 (1) 中の m が 1 であるクロマノール配糖体だけを得ることができる。この際の反応温度は 2 0 ~ 7 0 °C、好ましくは 3 0 ~ 6 0 °C であり、反応時間は 0. 1 ~ 4 0 時間、好ましくは 1 ~ 2 4 時間である。但し、これらの条件は使用する酵素の量により影響を受ける。次に、上記グルコアミラーゼ処理後の液を、XAD (オルガノ株式会社) を担体として用いたカラムクロマトグラフィー処理することにより、一般式 (1) 中の m が 1 であるクロマノール配糖体が高純度で得られる。

【0026】

一般式 (1) 中の m が 2 であるクロマノール配糖体を得る場合には、上記と同様の条件下で、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼによって得られる一般式 (1) における m が 1 から 8 位の混合物の形態を有するクロマノール配糖体に β -アミラーゼ (EC 3. 2. 1. 2) を作用させることにより、一般式 (1) における m が 1 または 2 であるクロマノール配糖体のみが得られる。この時の反応温度は 2 0 ~ 7 0 °C、好ましくは 3 0 ~ 6 0 °C であり、反応時間は 0. 1 ~ 4 0 時間、好ましくは 1 ~ 2 4 時間である。但し、これらの条件は使用する酵素量により影響を受ける。 β -アミラーゼ処理後の液は、XAD (オルガノ株式会社) を担体として用いたカラムクロマトグラフィー処理により、一般式 (1

）における m が2であるクロマノール配糖体が高純度で得られると同時に、一般式（1）における m が1であるクロマノール配糖体も得られる。

【0027】

一般式（1）における m が3以上であるクロマノール配糖体を得る場合には、上記と同様の条件下で、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼによって得られる一般式（1）における m が1から8位の混合物の形態を有するクロマノール配糖体を、HPLCを用いた分取クロマトグラフィーなどで処理することにより、高純度のクロマノール配糖体が各 m 毎に得ることができる。

【0028】

上記実施態様では2-置換アルコールにグルコース残基やマルトオリゴ糖残基を糖残基として結合させる場合の態様を記載したが、ガラクトース残基、 β -グルコース残基、マンノース残基、フルクトース残基等を糖残基として2-置換アルコールに結合させることによる態様も本発明では好ましく使用できる。このような態様においては、上記糖転位作用を触媒する酵素の項において説明した適切な酵素をそれぞれ使用する以外は上記実施態様と同様の操作を行うことによって、目的とするクロマノール配糖体が高純度で得られる（特開平9-249688号公報、特願平9-176174号）。

【0029】

一方、本発明に用いられるクロマノール配糖体は、特願平10-75599号公報に記載の方法により、前記2-置換アルコールの6位の水酸基を保護基で保護したもの（以下「糖受容体」という）とアノマー位に脱離基を導入し他の水酸基を保護基で保護した糖の誘導体（以下、「糖供与体」という）とを縮合反応させることによっても製造できる（有機合成法）。

【0030】

上記反応において使用される糖受容体の6位の水酸基を保護する保護基としては、アセチル基、ベンゾイル基、ピバロイル基、クロロアセチル基、レプリノイル基、ベンジル基、 p -メトキシベンジル基、アリル基、 t -ブチルジメチルシリル基、 t -ブチルジフェニルシリル基、トリメチルシリル基およびトリチル基等が挙げられ、特にアセチル基およびベンゾイル基が好ましい。

【0031】

上記反応において使用される糖供与体のアノマー位に導入される脱離基としては、塩素、臭素やフッ素等のハロゲン原子、チオメチル基、チオエチル基やチオフェニル基等の硫黄化合物およびトリクロロアセトイミド基などが挙げられ、特に臭素、塩素、チオメチル基、チオエチル基、チオフェニル基およびトリクロロアセトイミド基が好ましい。また、アノマー位以外の水酸基を保護する保護基としては、アセチル基、ベンゾイル基、ピバロイル基、クロロアセチル基及びレブリノイル基等のアシル系保護基、およびベンジル基、p-メトキシベンジル基、アリル基、t-ブチルジメチルシリル基、t-ブチルジフェニルシリル基、トリメチルシリル基及びトリチル基等のエーテル系保護基が挙げられ、中でもアシル系保護基、特にアセチル基が好ましい。

【0032】

これらの糖供与体は、周知の方法により糖の全ての水酸基へ保護基を導入し、次いでアノマー位を脱離基に置換することにより容易に調製することができる。

【0033】

上記糖受容体と糖供与体の縮合反応について示せば、まず、糖受容体と糖供与体を非極性溶媒に溶解する。糖受容体と糖供与体の仕込量は、糖受容体に対する糖供与体のモル比が1.0~1.5、好ましくは1.1~1.3がよい。非極性溶媒としては、塩化メチレン、ベンゼン等が挙げられる。

【0034】

次に、無水条件下で活性化剤の存在下で糖供与体及び糖受容体の縮合反応を行う。活性化剤としては、三フッ化ホウ酸・エーテル錯体、過塩素酸銀、トリフルオロメタンスルホン酸銀、臭化水銀、シアン化水銀、N-ヨードコハク酸イミド、トリフルオロメタンスルホン酸、ジメチルメチルチオスルホニウムトリフラート、p-トルエンスルホン酸等が挙げられ、特に、臭素を糖誘導体の脱離基として使用した場合には過塩素酸銀等の重金属塩を使用することが好ましい。反応温度は5~30℃、好ましくは10~25℃がよく、反応時間は12~48時間、好ましくは20~30時間がよい。

【0035】

次いで得られた反応物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー等で精製し、保護基を水酸化ナトリウムおよびメタノール性塩酸等で脱保護することにより、2-(β -L-フコピラノシル)メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オール、2-(α -L-ラムノピラノシル)メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オール、2-(β -D-キシロピラノシル)メチル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オール等を得ることができる(特願平10-75599号)。

【0036】

上記酵素法または有機合成法により得られたクロマノール配糖体は、一般的に、極めて高い水溶性(約100g/100ml)を有し、かつ油溶性にも富む(オクタノール/水系分配係数>3)両親媒性分子である。いいかえると、本発明によるクロマノール配糖体は、高い脂質親和性を備えた水溶性ビタミンEであるといえることができる。したがって、本発明によるクロマノール配糖体は、従来の水に不溶性あるいは貧溶性のビタミンE誘導體とは異なり、水に溶解して使用しても高い脂質親和性を保つので、細胞膜を透過しさらに細胞内にも入ることができ、生体内の抗酸化防御系を補強し、動脈硬化症の患部における活性酸素およびフリーラジカルを効果的に抑制、調節して動脈硬化症を予防し、または動脈硬化症の病態を飛躍的に改善する。また、上記反応により得られたクロマノール配糖体は、熱安定性およびpH安定性に関してもトコフェロール、トロロックスまたは2-置換アルコールに比べて著しく向上するものである。

【0037】

本発明の動脈硬化症の予防および治療剤は、前記クロマノール配糖体を製薬上許容される担体と配合したまたは製薬上許容される溶剤に溶解もしくは懸濁した組成物として、経口的または非経口的に患者に投与できる。

【0038】

本剤を経口投与用とする場合には、前記クロマノール配糖体を適当な添加剤、例えば、乳糖、ショ糖、マンニット、トウモロコシデンプン、合成もしくは天然ガム、結晶セルロース等の賦形剤、デンプン、セルロース誘導體、アラビアゴム、ゼラチン、ポリビニルピロリドン等の結合剤、カルボシキメチルセルロース

カルシウム、カルボシキメチルセルロースナトリウム、デンプン、コーンスターチ、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸ナトリウム等の滑沢剤、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、リン酸カルシウム、リン酸ナトリウム等の充填剤または希釈剤等を適宜混合して、錠剤、散剤（粉末）、丸剤、および顆粒剤等の固型製剤にすることができる。また、硬質または軟質のゼラチンカプセル等を用いてカプセル剤としてもよい。これらの固型製剤には、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートスクシネート、セルロースアセテートフタレート、メタアクリレートコポリマー等の被覆用基剤を用いて腸溶性被覆を施してもよい。さらに、前記クロマノール配糖体を、精製水等の一般的に用いられる不活性希釈剤に溶解して、必要に応じて、この溶液に浸潤剤、乳化剤、分散助剤、界面活性剤、甘味料、フレーバー、芳香物質等を適宜添加することにより、シロップ剤、エリキシル剤等の液状製剤とすることもできる。

【0039】

また、本発明の動脈硬化症の予防および治療剤を非経口投与用とする場合には、前記クロマノール配糖体を精製水、リン酸緩衝液等の適当な緩衝液、生理的食塩水、リンガー溶液、ロック溶液等の生理的塩類溶液、エタノール、グリセリン及び慣用される界面活性剤等と適当に組み合わせた滅菌された水溶液、非水溶液、懸濁液、リポソームまたはエマルジョンとして、好ましくは注射用注入用または噴霧用滅菌水溶液として、静脈内、皮下、筋肉内、腹腔内、腸内、気管支内等に投与される。この際、液状製剤は、生理学的なpH、好ましくは6～8の範囲内のpHを有することが好ましい。さらに、本発明の動脈硬化症の予防および治療剤は、ペレットによる埋め込み、または坐薬用基剤を用いた坐薬として投与されることも可能である。

【0040】

上述したうち、好ましい製剤や投与形態等は、担当の医師によって選択される。

【0041】

本発明の動脈硬化症の予防および治療剤に含まれるクロマノール配糖体の濃度

は、投与形態、疾病の種類や重篤度や目的とする投与量などによって様々であるが、一般的には、原料の全重量に対して0.1～100重量%、好ましくは1～90重量%である。特に、本発明の製剤が経口投与される場合には、原料の全重量に対して1～100重量%、好ましくは5～90重量%であり、非経口投与される場合には、原料の全容量に対して0.1～90容量%、好ましくは1～80容量%であることが好ましい。この際、クロマノール配糖体の濃度が前記上限値を超えると過剰な投与量に見合った病態改善効果が得られず、前記下限値未満であると病態改善効果が十分に期待できずいずれも好ましくない。

【0042】

本発明の動脈硬化症の予防および治療剤の上記投与量は、患者の年齢、体重及び症状、目的とする投与形態や方法、治療効果、および処置期間等によって異なり、正確な量は医師により決定されるものであるが、通常、本剤が経口投与される場合には、クロマノール配糖体の投与量換算で、0.1～10000mg/kg体重/日の投与量の範囲であり、1日1～3回に分けて投与される。この際、1日当たりの経口投与量が多い場合には、1回に複数個の錠剤等の製剤を投与してもよい。また、本発明の動脈硬化症の予防および治療剤を非経口投与する場合には、クロマノール配糖体の投与量換算で、0.01～1000mg/kg体重/日の投与量になるように1日1～3回に分けて投与される。

【0043】

【実施例】

次に本発明の動脈硬化予防および治療剤の薬理効果を、高コレステロール負荷ウサギおよび家族性高コレステロール血症のモデルであるWHHL (Watanabe heritable hyperlipidemic) ウサギを用いた薬理試験によりさらに詳細に説明する。なお、データは全て平均±標準誤差 (SE) で表し、群間における有意差検定はStudentのt-検定により行った。また、危険率は $p < 0.05$ を有意差ありとした。

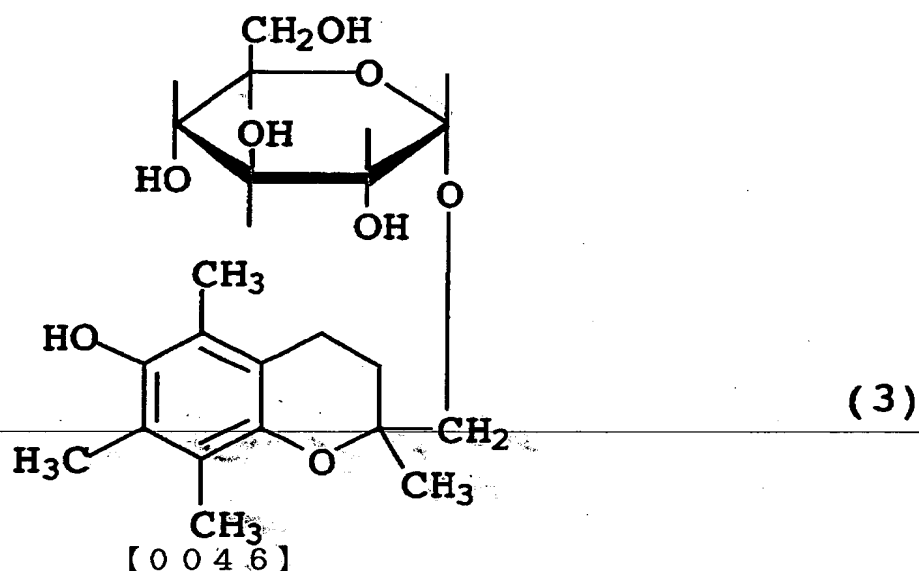
【0044】

クロマノール配糖体として、特開平7-118287号公報の実施例1に記載の方法で製造した下記式(3)で示される2-(α -D-グルコピラノシル)メ

チル-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-6-オール (TMG) を用いた

【0045】

【化4】



コレステロール負荷ウサギモデルによる病変抑制効果

1. 使用動物および飼育条件

試験には、入荷時の週齢が7週齢で雌および雄のNew Zealand White (NZW) 系ウサギ (SPF: 北山ラベルズ株式会社) を検疫および2週間の馴化飼育し、一般状態の観察を行い異常が無かったことを確認した後に使用した。投与開始時 (9週齢) の体重範囲は雄が1.8~2.2kg、雌が1.6~2.0kgであった。動物は実験期間を通じて、温度20~26℃、相対湿度40~70%、換気回数10~20回/時間、照明時間12時間 (7:00~19:00) の範囲内に設定したクリーン飼育室内のステンレス製ラックに設置されたアルミ製ハンガーゲージに一羽ずつ収容して飼育した。飼料には放射線滅菌された市販固形飼料 (1%コレステロール含有RC4; オリエンタル酵母株式会社) を使用し、飲料水は水道水を自動給水装置により摂取させた。

【0047】

2. 投与量の設定および投与方法

TMGの投与量は800mg/羽/日とした。TMGは特級エタノールに溶解後、1%コレステロール含有飼料に噴霧し風乾させた。飼料100g当たり800mgのTMGが含有されるように混餌飼料を調製した。この混餌飼料を1羽当たり100g/日として12週間毎朝ウサギに与えることで、TMGを経口摂取させた。コントロール群の飼料はエタノールのみを1%コレステロール含有飼料に噴霧し風乾させたものを1羽当たり100g/日として12週間毎朝ウサギに与えた。

【0048】

3. 群構成および動物数

コントロール群およびTMG投与群を設け、コントロール群は雄雌3羽ずつで合計6羽とし、TMG投与群は雄雌4羽ずつで合計8羽とした。これらの動物は、出来る限り同腹の仔が同じ群にならないように考慮し、馴化期間終了時の体重および血清の総コレステロール値から、各群の平均体重および総コレステロールの平均値が出来る限り等しくなるようにランダムに割り当てた。

【0049】

4. 血液生化学的検査および体重測定

投与開始前、投与4、8週および投与最終日(12週目)に12時間絶食させたウサギの心臓または耳介動脈より血液約6mlを採取し、遠心分離した血清について表1に示す項目をAutomatic analyzer(736-20、日立株式会社)で測定した。また、体重は投与期間中1週間に1回の割合で測定した。結果を表2に示す。

【0050】

【表 1】

検査項目	測定法
トランスアミナーゼ (GOT, GPT)	J S C C 準拠処方
アルカリフォスファターゼ (ALP)	p-ニトロフェニルリン酸基質法
乳酸脱水素酵素 (LDH)	Wr ob l e w s k i - L a D u e 法
コリンエステラーゼ (ChE)	ヨウ化ブチルチオコリン基質法
アルブミン (ALB)	B C G 法
総コレステロール (T-CHO)	C H O E R · C H O O D · E M S E 法
トリグリセライド (TG)	G K · G - 3 - P O D · E M S E 法
リン脂質 (PL)	コリンオキシダーゼ H S D A 法
高比重リポタンパクコレステロール (HDL-CHO)	リントングズデン酸 マグネシウム塩沈殿法

【0051】

【表 2】

		体重 (kg)	GOT (mU/ml)	T-CHO (mg/dl)	TG (mg/dl)	PL (mg/dl)	HDL-CHO (mg/dl)
コントロール 群	投与前	1.9±0.1	20.8±1.7	49±5	79±8	83±6	21±2
	12週目	3.0±0.1	32.5±3.9	3015±432	319±87	86±103	39±7
TMG 投与群	投与前	1.9±0.1	20.4±3.1	52±5	64±9	94±7	22±2
	12週目	2.9±0.1	19.7±2.2*	2628±148	250±76	851±42	33±5

* p<0.05 vs コントロール群

【0052】

5. リポタンパク分析

投与開始前、投与6、12週目に12時間絶食させたウサギの心臓または耳介動脈より血液約10mlを採取し、遠心分離した血清についてBeckman L-70K (ローター; Beckman 70.1Ti) を用いHatchおよびLeesの方法による超遠心分離法 (Hatch, F. T., and Lees, R. S. (1968) Advan. Lipid Res. 6, 1-68) により、低比重リポタンパク ($1.006 < d < 1.063$) を分離し、LDL画分のコレステロール量をコレステロールオキシダーゼ・DASO法により、HDL-

コレステロール量は血清よりリントングステン酸・マグネシウム塩沈殿法により測定した。また、TMG量をHPLC法により測定した。結果を表3に示す。

【0053】

【表3】

		LDL-CHO (mg/dl)	LDL-TMG (μ g/dl)
コントロール群	投与前	17 \pm 3	0
	12週目	630 \pm 83	0
TMG投与群	投与前	18 \pm 3	検出できず
	12週目	620 \pm 34	検出できず

【0054】

6. 大動脈病変評価

12週目、ネンブタール30mg/kgの腹腔内投与による麻酔下において正中開腹し、心臓起始部から腸骨動脈分岐部までの大動脈を1標品として摘出し、長軸方向に切開し、板にピンでとめて中性ホルマリンで固定した。そして、ズダン染色を行い全大動脈面積中の脂質沈着の占める面積 (surface involvement (%)) を画像処理ソフト (NIH Image Freeware) を用いて求めた。結果を表4に示す。

【0055】

【表4】

	Surface involvement (%)
コントロール群	79.7 \pm 3.2
TMG投与群	50.2 \pm 5.7**

** p<0.01 vs コントロール群

【0056】

コントロール群においては肝障害発現の指標であるGOTの上昇が認められたが、TMG投与群においてはその抑制を有意に抑制しており肝障害抑制効果が認められた。その他、血液生化学的検査においてTMG投与群において異常は認め

られなかった。TMGには動脈硬化および虚血性心疾患と正の相関がある血清脂質（T-CHO、TG、PL、LDL-CHO）を低下させる作用は認められず、また、LDL中にその存在が認められないもののアテローム性動脈硬化症の発症を有意に抑制できることが明らかとなった。また、動脈硬化および虚血性心疾患と負の相関があることが知られているHDL-コレステロールを低下させる作用は認められなかった。

【0057】

WHHLウサギモデルによる病変抑制効果

1. 使用動物および飼育条件

試験には、入荷時の週齢が8週齢で雌および雄のWHHL系ウサギ（SPF：北山ラベルズ株式会社）を検疫および馴化飼育し、一般状態の観察を行い異常が無かったことを確認した後に使用した。投与開始時（9週齢）の体重範囲は雄が1.5～1.9kg、雌が1.4～1.8kgであった。動物は実験期間を通じて、温度20～26℃、相対湿度40～70%、換気回数10～20回/時間、照明時間12時間（7:00～19:00）の範囲内に設定したクリーン飼育室内のステンレス製ラックに設置されたアルミ製ハンガーゲージに一羽ずつ収容して飼育した。飼料には放射線滅菌された市販固形飼料（R4；オリエンタル酵母株式会社）を使用し、飲料水は水道水を自動給水装置により摂取させた。

【0058】

2. 投与量の設定および投与方法

TMGの投与量は800mg/羽/日とした。TMGは特級エタノールに溶解後、飼料に噴霧し風乾させた。飼料100g当たり800mgのTMGが含有されるように混餌飼料を調製した。この混餌飼料を1羽当たり100g/日として27週間毎朝ウサギに与えることで、TMGを経口摂取させた。コントロール群の飼料はエタノールのみを飼料に噴霧し風乾させたものを1羽当たり100g/日として27週間毎朝ウサギに与えた。

【0059】

3. 群構成および動物数

コントロール群およびTMG投与群を設け、各群雄雌3羽ずつで合計12羽の

ウサギを使用した。これらの動物は、出来る限り同腹の仔が同じ群にならないように考慮し、馴化期間終了時の体重および血清の総コレステロール値から、各群の平均体重および総コレステロールの平均値が出来る限り等しくなるようにランダムに割り当てた。

【0060】

4. 血液生化学的検査および体重測定

投与開始前、投与4、8、16週および投与最終日（27週目）に12時間絶食させたウサギの心臓または耳介動脈より血液約6mlを採取し、遠心分離した血清について表5に示す項目をAutomatic analyzer（736-20、日立株式会社）で測定した。また、体重は投与期間中1週間に1回の割合で測定した。結果を表6に示す。

【0061】

【表5】

検査項目	測定法
トランスアミナーゼ (GOT, GPT)	JSCC準拠処方
アルカリフォスファターゼ (ALP)	p-ニトロフェニルリン酸基質法
乳酸脱水素酵素 (LDH)	Wroblewski-La Due 法
コリンエステラーゼ (ChE)	ヨウ化ブチルチオコリン基質法
アルブミン (ALB)	BCG法
総コレステロール (T-CHO)	CHOER・CHOOD・EMSE法
トリグリセライド (TG)	GK・G-3-POD・EMSE法
リン脂質 (PL)	コリンオキシダーゼーHSDA法
高比重リポタンパクコレステロール (HDL-CHO)	リントングステン酸・マグネシウム塩沈殿法

【0062】

【表 6】

		体重 (kg)	T-CHO (mg/dl)	TG (mg/dl)	PL (mg/dl)	HDL-CHO (mg/dl)
コントロール 群	投与前	1.6±0.1	877±53	254±34	464±18	6±1
	27週目	2.9±0.1	848±39	166±17	455±18	5±1
TMG 投与群	投与前	1.6±0.1	888±46	219±24	472±23	6±1
	27週目	3.0±0.1	934±49	169±23	459±52	5±1

【0063】

5. リポタンパク分析

投与開始前、投与12、26週目に12時間絶食させたウサギの心臓または耳介動脈より血液約10mlを採取し、遠心分離した血清について Beckman L-70K (ローター; Beckman 70.1Ti) を用い Hatch および Lees の方法による超遠心分離法 (Hatch, F. T., and Lees, R. S. (1968) Advan. Lipid Res. 6, 1-68) に
より、低比重リポタンパク ($1.006 \leq d \leq 1.063$) を分離し、LDL画分のコレステロール量をコレステロールオキシダーゼ-DASO法により、HDL-コレステロール量は血清よりリシタングステン酸マグネシウム塩沈殿法により測定した。また、TMG量をHPLC法により測定した。結果を表7に示す。

【0064】

【表 7】

		LDL-CHO (mg/dl)	LDL-TMG (μg/dl)
コントロール 群	投与前	539±29	0
	26週目	723±33	0
TMG 投与群	投与前	573±35	検出できず
	26週目	746±29	検出できず

【0065】

6. 大動脈病変評価

27週目、ネンブタール30mg/kgの腹腔内投与による麻酔下において正中開腹し、心臓起始部から腸骨動脈分岐部までの大動脈を1標品として摘出し、長軸方向に切開し、板にピンでとめて中性ホルマリンで固定した。そして、ズダ

ン染色を行い全大動脈面積中の脂質沈着の占める面積 (surface involvement (%)) を画像処理ソフト (NIH Image Freeware) を用いて求めた。結果を表 8 に示す。

【0066】

【表 8】

	Surface involvement (%)
コントロール群	64.6±3.9
TMG 投与群	52.4±4.7*

* $p < 0.05$ vs コントロール群

【0067】

血液生化学的検査において TMG 投与群において異常は認められなかった。TMG には動脈硬化および虚血性心疾患と正の相関がある血清脂質 (T-CHO、TG、PL、LDL-CHO) を低下させる作用は認められず、また、LDL 中にその存在が認められないもののアテローム性動脈硬化症の発症を有意に抑制できることが明らかとなった。また、動脈硬化および虚血性心疾患と負の相関があることが知られている HDL-コレステロールを低下させる作用は認められなかった。

【0068】

急性毒性試験

本発明の動脈硬化症予防および治療剤について急性毒性試験を行い、その安全性を確認した。4～5週令の ICR 系マウスを 1 群 3 匹として用い、クロマノール配糖体として上記と同じ TMG を 5% アラビアゴム液に懸濁した後、TMG 換算で 500 mg/kg を経口投与して 1 週間観察した。この際、対照群として 5% アラビアゴム液を 0.3 ml 経口投与した。その結果、いずれの投与群においてもマウスの死亡例は認められなかった。

【0069】

製剤例 1

TMG 100 g、乳糖 800 g および トウモロコシデンプン 100 g をブレンダーで混合して散剤を得た。

【0070】

製剤例 2

TMG 100 g、乳糖 450 g および 低置換度ヒドロキシプロピルセルロース 100 g を混合した後、10% ヒドロキシプロピルセルロース水溶液 350 g を加えて混練した。これを押出し造粒機を用いて造粒、乾燥して顆粒剤を得た。

【0071】

製剤例 3

TMG 100 g、乳糖 550 g、トウモロコシデンプン 215 g、結晶セルロース 130 g および ステアリン酸マグネシウム 5 g をブレンダーで混合した後、錠剤機で打錠して錠剤を得た。

【0072】

製剤例 4

TMG 10 g、乳糖 110 g、トウモロコシデンプン 58 g および ステアリン酸マグネシウム 2 g を V 型混合機を用いて混合した後、3 号カプセルに 180 mg ずつ充填してカプセル剤を得た。

【0073】

製剤例 5

TMG 200 mg および グルコース 100 mg を精製水 2 ml に溶解した後濾過し、濾液を 2 ml アンプルに分注、封入した後滅菌して注射剤を得た。

【0074】

【発明の効果】

上述したように、本発明の動脈硬化症予防および治療剤は、水溶性のクロマノール配糖体を有効成分とするので、生体内の抗酸化防御系を補強し、動脈硬化症の患部における活性酸素およびフリーラジカルを効果的に抑制、調節して、動脈硬化症における病変を顕著に抑制し、病態を飛躍的に改善することができる。

【0075】

また、本発明は、高い水溶性を有するクロマノール配糖体を有効成分とするの

で、固形製剤として用いるほか、有効成分を高濃度で含有する水性製剤とすることができ、少用量で患部に効果的に作用し、動脈硬化症を予防、治療することができる。できるとともに、副作用を伴わないので極めて安全に使用することができる。

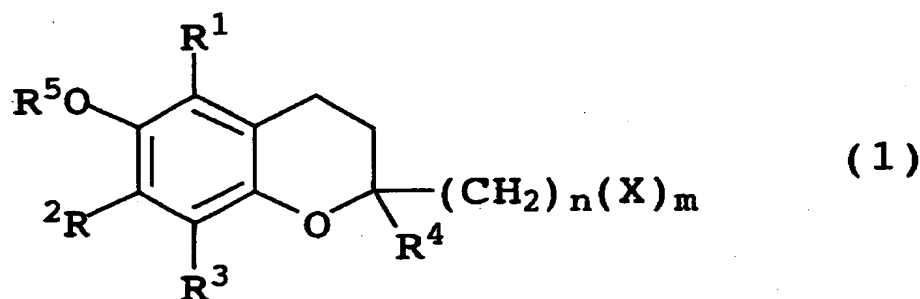
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 安全かつ少用量で患部に効果的に作用し、動脈硬化症を予防、治療しうる新規な動脈硬化症の予防および治療剤を提供する。

【解決手段】 下記一般式(1)

【化1】



〔ただし、式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は同一または異なる水素原子または低級アルキル基を表し、 R^5 は水素原子、低級アルキル基または低級アシル基を表し、 X は糖残基中の水酸基の水素原子が低級アルキル基または低級アシル基で置換されていてもよい単糖残基またはオリゴ糖残基を表し、 n は 0～6 の整数であり、および m は 1～6 の整数である〕で表されるクロマノール配糖体を有効成分とする動脈硬化症予防および治療剤である。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第025392号
受付番号	59900087728
書類名	特許願
担当官	清水 スズ子 1350
作成日	平成11年 3月10日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000106771
【住所又は居所】	岐阜県関市新迫間12番地
【氏名又は名称】	シーシーアイ株式会社

【特許出願人】

【識別番号】	596156174
【住所又は居所】	京都府宇治市菟道荒槇1-51
【氏名又は名称】	吉川 敏一

【代理人】

申請人	
【識別番号】	100072349
【住所又は居所】	東京都千代田区二番町11番地9 ダイアパレス 二番町
【氏名又は名称】	八田 幹雄

【選任した代理人】

【識別番号】	100102912
【住所又は居所】	東京都千代田区二番町11番地9 ダイアパレス 二番町 八田国際特許事務所
【氏名又は名称】	野上 敦

【選任した代理人】

【識別番号】	100110995
【住所又は居所】	東京都千代田区二番町11番地9 ダイアパレス 二番町 八田国際特許事務所
【氏名又は名称】	奈良 泰男

【選任した代理人】

【識別番号】	100111464
【住所又は居所】	東京都千代田区二番町11番地9 ダイアパレス 二番町 八田国際特許事務所
【氏名又は名称】	齋藤 悦子

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000106771]

1. 変更年月日 1996年12月25日
[変更理由] 住所変更
住 所 岐阜県関市新迫間12番地
氏 名 シーシーアイ株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596156174]

1. 変更年月日 1996年10月29日
[変更理由] 新規登録
住 所 京都府宇治市菟道荒槇1-51
氏 名 吉川 敏一

THIS PAGE BLANK (USPTO)